

BEST AVAILABLE COPY

Rec'd PCT/PTO 27 SEP 2004

PCT/JP03/03867

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

10/509379

27.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 3月29日

出願番号

Application Number:

特願2002-094313

[ST.10/C]:

[JP2002-094313]

出願人

Applicant(s):

山之内製薬株式会社

REC'D 23 MAY 2003

WIPO

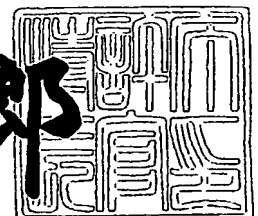
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033397

【書類名】 特許願

【整理番号】 0000003127

【提出日】 平成14年 3月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 45/00 AAH

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県前橋市古市町1丁目13-7

【氏名】 石内 勝吾

【特許出願人】

【識別番号】 000006677

【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089200

【弁理士】

【氏名又は名称】 長井 省三

【電話番号】 03-5916-5530

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005348

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 神経膠芽腫治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 AMPA受容体阻害活性を有する化合物を有効成分とする神経膠芽腫治療剤。

【請求項 2】 AMPA受容体阻害活性を有する化合物が、[2, 3-ジオキソ-7-(1H-イミダゾール-1-イル)-6-ニトロ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノキサリン-1-イル] 酢酸又はその塩、又は2, 3-ジヒドロキシ-6-ニトロ-7-スルファモイル-ベンゾ(F)-キノキサリン又はその塩である請求項 1 記載の神経膠芽腫治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、AMPA受容体拮抗作用を有する化合物の神経膠芽腫の治療剤としての新規な医薬用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

グリオーマは、グリアの幹細胞である上衣膠芽細胞から、上衣細胞、アストログリア、オリゴデンドログリアなどへ分化する過程で腫瘍化したものの総称である（生化学辞典 第三版 東京化学同人、東京、1998）。

神経膠芽腫（glioblastoms multiforme、以下glioblastomaともいう。）は、グリオーマの中でも、中枢神経系において最も蔓延し、悪性度が高く、悪性脳腫瘍の代表的なものである。

また、その致死率も非常に高く、発症してから9～12ヶ月で死に至る。各種治療法が進歩した今日でも、1986年から1990年の5年生存率(8.0%)は、20年前の1969年から1975年の5年生存率(11.9%)と比較しても、殆ど変化がなく（神経進歩 43(3), 338-350, 1999）、有効な治療法の確立が切望されている。

神経膠芽腫の癌細胞は、脳腫瘍の中でも最も未分化型で、遊走性が高く、高い浸潤性を有し、予後が極めて悪い。

神経膠芽腫は、未分化星細胞又は前駆細胞からの悪性化の遺伝子的な機序の違いにより、原発性神経膠芽腫 (Primary glioblastoma de novo)、及び続発性神経膠芽腫 (Secondary glioblastoma) に分類される。続発性神経膠芽腫は、45歳以下の若年層に発症し、星細胞腫から平均4-5年のうちに未分化星細胞腫を経て発症する。一方、原発性神経膠芽腫は、平均55歳の高年齢層に多く発症し、通常、何ら臨床的・病理学的に異常の見られない状態から3ヶ月以内で発症する劇症型の神経膠芽腫 (de novo glioblastomaとも言われる。) である (Pathology and Genetics of the Nervous Systems. 29-39 (IARC Press, Lyon, France, 2000))。

神経膠芽腫は有髄神経に沿って遊走し、中枢神経中に広範に拡大することから、外科的処置では十分な治療効果は得られない (Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 34, 91-94, 1994, Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 33 425-428, 1993, Neuropathology 17, 186-188, 1997)。また、日本において、神経膠芽腫の適応症を有する薬剤は、ラニムスチンや、インターフェロン等限られたものであり、その有効性は不十分である。

α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸 (AMPA) 型グルタメート受容体は、中枢神経で、殆ど全ての興奮性シナプスの早い神経伝達を司っている (Trends Neurosci. 16, 359-365, 1993, Annu. Rev. Neurosci. 17, 31-108, 1994, Prog. Neurobiol. 54, 581-618, 1998)。AMPA受容体は神経細胞と同様に多くのグリア細胞にも発現している (Trends Pharmacol. Sci. 21, 252-258, 2000)。AMPA受容体は、4つのサブユニット GluR1-4からなる。AMPA受容体の Ca^{2+} 透過性はサブユニットの構成に依存する。即ち、GluR2サブユニットを有する受容体は、 Ca^{2+} 透過性が低く、GluR2を持たない受容体は、 Ca^{2+} 透過性が高い。GluR2サブユニットが多いほど、 Ca^{2+} 透過性は減少する (Trends Neurosci. 16, 359-365, 1993, Annu. Rev. Neurosci. 17, 31-108, 1994, Prog. Neurobiol. 54, 581-618, 1998)。GluR2の独特の性質は、2番目の疎水部分 (M2) の1アミノ酸残基に由来する。この残基は、GluR2ではアルギニン (R) であるが、他のサブユニットの対応する部分はグルタミン (Q) である。この臨界部分 (Q/R site) のアルギニンがグルタミンに置き換えられた場合、置換GluR2(Q)

によって構成されるホモマー受容体は、高 Ca^{2+} 透過性を示す (Trends Neurosci. 16, 359-365, 1993, Annu. Rev. Neurosci. 17, 31-108, 1994)。

【0003】

悪性グリオーマ、即ち退形成星細胞腫及び神経膠芽腫等には、2つの特徴、即ち、増殖性と遊走性を有する。これらに類似する特徴は、皮質オリゴデンドロサイトー2型星状細胞前駆細胞 (cortical oligodendrocyte-type 2 astrocyte progenitor, O-2A) や、グリオーマの起源候補であるグリア前駆細胞でも見られる (Glial Cell Development 209-220, BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK. 1996, Glia 15, 222-230, 1995)。

皮質オリゴデンドロサイトー2型星状細胞前駆細胞はAMPA受容体を発現している。血小板由来成長因子(PDGF)等の成長因子と塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)の組合せは、O-2A細胞を未分化状態に維持し、GluR1及び／又はGluR4サブユニットの発現を選択的に増加させる (J. Neurosci. 17, 227-240, 1997, Glia 10, 149-153, 1994)。

一方、CG-4 (オリゴデンドロサイト前駆体) におけるGluR2の増加は、2型星状細胞とオリゴデンドロサイトへの分化を誘発する (J. Neurosci. 16, 519-530, 1996)。

グリオーマ細胞とグルタメートに関しては、C6-gliomaにはGluR2遺伝子の発現が低いこと (J. Neurosci. Res. 46, 164-178, 1996) や、66%のglioblastoma培養細胞がグルタメート受容体アゴニストに反応し脱分極する (Eur. J. Neurosci. 10, 2153-2162, 1998) ことが報告されている。

【0004】

W000/24395には、癌治療のためのAMPA受容体複合体とグルタメートの相互作用を阻害する方法に関する発明が開示され、脳腫瘍の具体例として、胎児性腫瘍に分類される髄芽腫 (medulloblastoma)、グリオーマの一種である脳星細胞腫 (human brain astrocytoma) が挙げられ、脳星細胞腫に対するAMPA受容体拮抗剤GYKI52446のin vitroの効果が示されている。

しかしながら、上記文献には、AMPA受容体拮抗剤を、悪性度が高く、放射線治療や化学療法に抵抗性を有する神経膠芽腫の治療に用いることについては、開示

も示唆もない。

更に、上記発明者による論文(PNAS 98(11), 6372-6377, 2001)には、NMDAやAMPA受容体の拮抗剤は、末梢由来の癌細胞には感受性が高いが、神経やグリア細胞由来の癌細胞には感受性が低い旨の記載がある。更に、これらの拮抗剤は末梢癌の治療剤として有用であるとの記載がある。従って、神経膠芽腫よりも悪性度が低い癌細胞を用いたin vitroの効果からでは、本発明の神経膠芽腫に対する効果は予測できない。

また、Nature Medicine 7(9), 1010-1015, 2001には、NMDA受容体拮抗剤であるMK-801及びmemantinが、ラットglioblastomaであるC6及びRG2glioma移植モデルに対し、増殖抑制効果を示したことが報告されている。

しかしながら、動物モデルを用いた従来のグリオーマ研究は、実際の腫瘍の播種を再現していないとの批判がある(Nature Medicine 6(4), 369-370, 2000)。さらに上記論文の批評文(Nature Medicine 7(9), 994-995, 2001)のなかでもC6及びRG2gliomaを用いた動物モデルが、ヒト神経膠芽腫を反映するののかについても、疑問視されている。従って、ヒトの病態をよく反映する動物モデルを用いて効果を確認しなければ、ヒトの神経膠芽腫の治療効果は予測できない。

一方、PNAS 98(25), 14687-14692, 2001には、種々のヒト神経膠芽腫から得たcell lineには、カルシウム透過性の高い非編集型GluR-Bが発現しており、これが神経膠芽腫の強い増殖能に寄与していることが予測されている。

しかしながら、上記文献では実際にAMPA受容体拮抗剤によるこれらのglioblastoma細胞株の増殖抑制効果を確認しておらず、これらの細胞株が動物モデルにおいてもヒトの神経膠芽腫の特徴を再現できるものなのか、また、AMPA受容体拮抗剤が実際にヒトの神経膠芽腫の増殖抑制剤として効果を有するかどうかは、予測できない。

従って、AMPA受容体拮抗剤が、ヒト神経膠芽腫の優れた増殖抑制作用を有することは、開示も示唆もない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は新規な作用機序を有する神経膠芽腫治療剤を提供することであ

る。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記の課題を達成すべく鋭意研究を行ったところ、神経膠芽腫細胞、特に、ヒトの原発性神経膠芽腫細胞には、GluR1及び／又はGluR4サブユニットが広範に発現し、 Ca^{2+} 透過性AMPA受容体として機能していることを見いだした。即ち、アデノウィルスベクター仲介によるGluR2遺伝子の導入によって、生体内の Ca^{2+} 透過性AMPA受容体が、 Ca^{2+} 不透過性AMPA受容体に転換したことが、遊走性を抑制し、神経膠芽腫細胞のアポトーシスを誘発したことを確認した。また、逆に、 Ca^{2+} 透過性AMPA受容体の過剰な発現が癌細胞の形態変化と増殖亢進だけでなく、遊走性をも促進したことを見いだした。

また、本発明者は、ヒトの神経膠芽腫の病理学的特徴をよく反映する動物モデルを構築し、本発明の効果の確認に用いた。本発明者が樹立したヒトglioblastomaの細胞株CGNH-89を移植した動物モデルは、脳実質内、脳軟膜下に激しく浸潤し、髄膜播種を生じ、ヒトの神経膠芽腫の病理学的特徴を反映するものである。

従って、神経膠芽腫細胞のAMPA受容体がGluR1及び／又はGluR4サブユニットで構成されGluR2を発現していないことから、該AMPA受容体の高い Ca^{2+} 透過性が、神経膠芽腫細胞の高い増殖性、遊走性に関与するとの知見に基づき、実際に、AMPA受容体の阻害活性を有する化合物が、ヒト神経膠芽腫を反映する動物モデルでの増殖抑制効果を有することを確認し、本発明を完成した。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明について更に説明すると、次の通りである。

神経膠芽腫とは、原発性神経膠芽腫及び続発性神経膠芽腫を意味し、好ましくは、原発性神経膠芽腫である。

神経膠芽腫治療剤とは、神経膠芽腫の増殖抑制効果、生存期間の延長、或いは生存率の上昇効果を意味する。

増殖抑制効果とは、本発明に用いる化合物を神経膠芽腫を発症する動物、好ましくはヒトの神経膠芽腫患者に投与したとき、その神経膠芽腫の体積が、該化合

物を投与しない場合に比較して減少或いは増殖しない効果を意味する。

生存期間の延長とは、本発明に用いる化合物を神経膠芽腫を発症する動物、好ましくはヒトの神経膠芽腫患者に投与したとき、該疾患に適用される各種治療の処置或いは無処置の平均生存期間よりも生存期間が延長する効果を意味する。

生存率の上昇とは、本発明に用いる化合物を神経膠芽腫を発症する動物、好ましくはヒトの神経膠芽腫患者に投与したときの、1年乃至5年間、或いは5年以上の生存率が、該疾患に適用される各種治療の処置或いは無処置の生存率より上昇する効果を意味する。

本発明に従い使用することのできる化合物は、グルタメートレセプターのAMPA受容体を阻害する化合物である。

AMPA受容体の阻害活性を有する化合物とは、AMPA受容体のリガンド結合部位に競合的或いは、非競合的に結合し、AMPA受容体とグルタメートとの結合を阻害する作用を有する化合物、或いはAMPA受容体の結合部位に直接結合しないが、AMPA受容体のアロステリック調節部位に結合し、グルタメートによる神経伝達を遮断する作用を有する化合物が含まれる。

【0008】

好ましくは、2, 3-ジヒドロキシ-6-ニトロ-7-スルファモイル-ベンゾ(F)-キノキサリン (NBQX)、及びWO 96/10023に開示されたAMPA受容体拮抗剤である[2, 3-ジオキサ-7-(1H-イミダゾール-1-イル)-6-ニトロ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノキサリン-1-イル] 酢酸又はその塩である。

[2, 3-ジオキサ-7-(1H-イミダゾール-1-イル)-6-ニトロ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノキサリン-1-イル] 酢酸は酸又は塩基と塩を形成する。好ましくは、製薬学的に許容される塩である。

酸との塩としては塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸との鉱酸等の無機酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、炭酸、ピクリン酸、メンタスルホン酸、エンタスルホン酸、グルタミン酸等の有機酸との酸付加塩を挙げることができる。塩基との塩としてはナトリウム、カリウム、マグネ

シウム、カルシウム、アルミニウム等の無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミン等の有機塩基又はリジン、アルギニン、オルニチン等の塩基性アミノ酸との塩やアンモニウム塩が挙げられる。さらに、水和物、エタノール等との溶媒和物や結晶多形を形成することができる。

好ましくはゾナンパネル (zonampanel)、即ち、[2, 3-ジオキソ-7-(1H-イミダゾール-1-イル)-6-ニトロ-1, 2, 3, 4-テトラヒドロキノキサリン-1-イル] 酢酸・一水和物である。

【0009】

また、上記化合物の他にも、PCT国際公開パンフレットW0 97/19066に記載されているAMPAレセプター；Neurosearch(Denmark)によって開発され、市販されている化合物「NS-1201」または「NS-409」；Eli Lilly (United States) の化合物「LY-311446」(2-アミノ-3-(2-(3-(1H-テトラゾール-5-イル)フェノキシ)フェニル)プロピオン酸)、「LY-300164」(7-アセチル-5-(4-アミノフェニル)-8(R)-メチル-8, 9-ジヒドロ-7H-1, 3, -ジオキソ(4, 5h)(2, 3)ペンソジアゼピン)、「LY-293606」、「LY-293558」もしくは「GYKI-53655」または20th CINP(Melbourne), 1996, Abs S-40-1に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト；Novo Nordisk(Denmark)の化合物「NNC-07-0775」もしくはPCT国際公開パンフレット W0 96/15100に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト；Symphony Pharmaceuticals(United States)の化合物「SYM-2206」(4-(アミノフェニル)-1-メチル-6, 7-(メチレンジオキシ)-N-ブチル-1, 2-ジヒドロフタラジン-2-カルボキサミド)もしくはJournal of Medicinal Chemistry, 1996, 39, 343に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト；Servier(France)の化合物「S-17625」(6, 7-ジクロロ-2-(1H)-オキソキノン-3-リン酸)もしくはJournal of Medicinal Chemistry, 1996, 39, 197に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト；2-カルボキシ-1-メチル-7-トリフルオロメチルイミダゾ(1, 2-a)キノキサリン-4(5H)-オンもしくはPCT国際公開パンフレットW0 95/21842、W0 96/08492およびW096/08493に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト；6-(4-ピリジニル)-1H-1, 2, 3-トリアゾロ(4, 5-a)ピリミジン-4-(5H)-オンもしくはJournal of

Medicinal Chemistry 1995, 38, 587に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト ; PCT国際公開パンフレット WO 94/26747、WO 95/19346、WO 95/12594、WO 95/02601、WO 95/26342、WO 95/26349、WO 95/26350、WO 95/26351、WO 95/26352、WO 96/31511およびWO 95/02602に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト ; 2-アミノ-3-(3-ヒドロキシ-5-(2-チエニル) イソオキサゾール-4-イル) プロピオン酸もしくはPCT国際公開パンフレット WO 95/12587に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト ; Symphony Pharmaceutical(United States)の化合物「SYM-2250」 ; Servier(France)の化合物「S-18986」もしくは13th Int. Symp. Med. Chem. (Paris), 1994, Abs P29に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト ; Warner-Lambert(United States)の化合物「NNC-07-9202もしくは208th ACS (Washington, DC), 1994, Abs MEDI 170に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト ; 化合物「IDRA-21」 (7-クロロ-3-メチル-3, 4-ジヒドロ-2H-1, 2, 4-ベンゾチアジアジン-5, 5-ジオキシド) もしくはSoc. Neurosci. Abs (Washington, DC), 1993, Abs 124.7および124.8に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト ; Warner-Lambert(United States)の化合物「NS-409」もしくはJ. Med. Chem. 1995, 38, 3720又はPCT国際公開パンフレット WO 96/08494およびWO 96/08495に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト ; Neurosearch(Denmark)の化合物「NS-393」 ; Symphony Pharmaceuticals(United States)の化合物「SYM-2101」、「SYM-2007」および「SYM-2057」 ; Cortex Pharmaceutical(United States)の化合物「AMPAAlex」 (1-(1, 3-ベンゾジオキサロ-5-イルカルボニル) ピペリジン) もしくはScrip. 1995, 2088/9, 14およびScrip. 1996, 2187, 21もしくはPCT国際公開パンフレット WO 96/38414に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト ; 化合物「LY-293558」「LY-215490」およびデカヒドロ-6-(2-(1H-テトラゾール-5-イルエチル)-3-イソキノリンカルボン酸(CAS registry no. 154652-83-2)もしくはJ. Med. Chem., 1993, 36, 2046に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト ; 化合物「YM-90K」 (1, 4-ジヒドロ-6-(1H-イミダゾール-1-イル)-7-ニトロ-2, 3-キノキサリンジオン・1HCl(CAS registry no. 154164-30-4またはScrip. 1994, 1972, 14, もしくはPCT国際公開パンフレット WO 96/10023に記載されている全てのAMPAアンタ

ゴニスト；化合物「アロラセタム」(N-(2-(3-ホルミル-2, 5-ジメチル-1H-ピロール-1-イル)エチル)-アセトアミド(CAS registry no. 119610-26-3)もしくはヨーロッパ特許287988に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト；Warner-Lambertの化合物「NS-257」；Novo Nordisk(Denmark)の化合物「NNC-07-9202」、Kyorinの化合物「GRA-334」、Symphonyの化合物「SYM-2261」, 「SYM-2262」, 「SYM-2189」, 「SYM-2070」, 「SYM-2207」、Annovisの化合物「SYM-2259」, 「SYM-2257」、Pfizerの化合物「CP-15396」, 「PD-161989」, 「PD-160725」, 「PD-159265」、Novartisの化合物「AMP-397A」、Aventisの化合物「RPR-118723」、Egisの化合物「EGIS-88321」, 「EGIS-9637」, 「EGIS-7444」、Boehringer Ingelheimの化合物「BIIR-561-CL」、Neurosearchの化合物「NS-1209」、Novoの化合物「Fanapanel」, 「LU-73068」、Rocheの化合物「Ro-48-8587」、BTGの化合物「BTG-8457」, 「BTG-8452」、2-[N-(4-クロロフェニル)-N-メチルアミノ]-4H-ピリド[3, 2-e]-1, 3-チアジン-4-オンもしくはPCT国際公開パンフレット W096/26927に記載されている全ての非競合型AMPAアンタゴニスト；もしくはヨーロッパ特許283959およびScience, 1988, 241, 701に記載されている全てのAMPAアンタゴニスト；および、Roche (Switzerland)の「アニラセタム」もしくは1-(4-メトキシベンジル)-2-ピロリジノン(CAS registry no. 72432-10-1)またはヨーロッパ特許5143に記載されている全てのAMPAアンタゴニストからなる群より選択される化合物、及びエーザイの「E 2 0 0 7」が含まれ、これらのAMPA受容体阻害有効量を投与することを含む方法に係る。

【 0 0 1 0 】

また、以下の発行された米国特許（特許番号を列挙し、続いて、親出願の発行日を列挙する）を含め、幾つかの公開された特許に記載されたAMPA受容体を阻害する化合物も含まれる。：5,654,303(1997年8月5日)；5,639,751(1997年6月17日)；5,614,532(1997年5月25日)；5,614,508(1997年5月25日)；5,606,062(1997年2月25日)；5,580,877(1996年12月3日)；5,559,125(1996年9月24日)；5,559,106(1996年9月24日)；5,532,236(1996年7月2日)；5,527,810(1996年6月18日)；5,521,174(1996年5月28日)；5,519,019(1996年5月21日)；5

,514,680 (1996年5月7日) ; 5,631,373 (1997年5月20日) ; 5,622,952 (1997年4月22日) ; 5,620,979 (1997年4月15日) ; 5,510,338 (1996年4月23日) ; 5,504,085 (1996年4月2日) ; 5,475,008 (1995年12月12日) ; 5,446,051 (1995年8月29日) ; 5,426,106 (1995年6月20日) ; 5,420,155 (1995年5月30日) ; 5,407,935 (1995年4月18日) ; 5,399,696 (1995年3月21日) ; 5,395,827 (1995年3月7日) ; 5,376,748 (1994年12月27日) ; 5,364,876 (1994年11月15日) ; 5,356,902 (1994年10月18日) ; 5,342,946 (1994年8月30日) ; 5,268,378 (1993年12月7日) ; および、5,252,584 (1993年10月12日)。

上記化合物は、上記文献に記載された合成方法を参照し、製造することができる。

【 0 0 1 1 】

本発明の治療剤は、更に他の薬剤との併用が可能である。たとえば、AMPA受容体拮抗剤は単独で、あるいは他の抗腫瘍剤または他の増殖阻害剤もしくは他の薬剤または栄養剤とともに投与できる。

現在までに多数の抗腫瘍剤が市販或いは開発中にあり、これらは併用薬物として神経膠芽腫の処置に選択することができる。このような抗腫瘍剤は抗生物質型薬剤、アルキル化剤、抗代謝剤、免疫学的薬剤、インターフェロン型薬剤等がある。

具体的には、インターフェロンベータ（免疫強化薬インターフェロン）、塩酸ニムスチン（アルキル化薬）、ラニムスチン（アルキル化薬）、エトポシド（アルカロイド）、カルボプラスチン（白金製剤）、テモゾロマイド（temozolomide; アルキル化剤）等が挙げられる。

【 0 0 1 2 】

本発明に用いる化合物又はその塩の1種又は2種以上を有効成分として含有する製剤は、通常製剤化に用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製される。

製剤用の担体や賦形剤としては、固体又は液体いずれでも良く、例えば乳糖、ステアリン酸マグネシウム、スターチ、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコール等やその

他常用のものが挙げられる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与、あるいは静注、筋注等の注射剤、坐剤、経皮等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。

投与量は症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定されるが、通常成人1日当り100～2000mg、好ましくは1日当り900mg程度である。成人1日当り100～2000mgを、1回で、あるいは2～4回に分けて投与してもよい。静脈内投与や、持続的静脈内投与の場合には、一日当たり1時間から24時間で投与しても良い。

上記に示すとおり、投与量は種々の状態によって決められる。有効である場合は、上記の範囲よりも少ない投与量を用いることができる。

【0013】

本発明に用いられる化合物は、主に非経口投与、具体的には、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、経皮投与、髄腔内投与、硬膜外、関節内、及び局所投与、あるいは可能であれば経口投与等、種々の投与形態で投与可能である。

非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば注射用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80（商品名）等がある。このような組成物はさらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、ラクトース）、溶解補助剤（例えば、メグルミン酸）のような補助剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。また、これらは無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

本発明による経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられる。このような固体組成物においては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロ

リドン、メタケイ酸、アルミン酸マグネシウムと混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤や繊維素グルコール酸カルシウムのような崩壊剤、ラクトースのような安定化剤、グルタミン酸又はアスパラギン酸のような溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の糖衣、又は胃溶性あるいは腸溶性物質のフィルムで被膜してもよい。

経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

【0014】

【実施例】

次に、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

本発明の治療効果は、以下の実験方法により確認された。

実験例 1

in vitro 神経膠芽腫 (ヒト glioblastoma) 抑制作用

本実験にはヒト glioblastoma 細胞 (CGNH-89 cell line) を使用し、これらをランダムにグルタミン酸非含有培地 (対照) 群, グルタミン酸非含有培地にグルタミン酸 100 μ M を添加した群およびグルタミン酸非含有培地にグルタミン酸 100 μ M + NBQX 20 μ M を添加した群の 3 グループに群分けし、48 時間培養した。CGNH-89 cell は 10 % 透析血清 (fetal calf serum) を含有する DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 中で培養した。

CGNH-89 cell line

CGNH-89 cell line は、56 歳女性の右前頭側頭葉腫瘍より摘出し、Nicolas らの Explant 法 (Science 196, 60-63, 1977) に従って樹立した。該 cell line はグリア細胞繊維性酸性蛋白 (GFAP)、vimentin、A2B5、04 及びミエリン基礎蛋白に

活性を示す(J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57653-663, 1998)。また、AMPA受容体のサブユニットGluR1, GluR2, GluR2/3, GluR4抗体、及びRT-PCRによるGluR1-4 mRNAの解析の結果、該細胞株はGluR1及びGluR4を発現し、GluR2及びGluR3は発現していないという特徴を呈する。

抗腫瘍作用の評価は、培養後48 時間に、TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling) 法にてアポトーシスコアを算定した。また、Ki67 抗体を用いることによりヒトglioblastoma 細胞の増殖能を評価した。

結果は平均値±標準誤差で示し、Student's t-test法を用いて統計解析を行った。p<0.05を有意水準とした。

試験結果

グルタミン酸非含有群では、48時間の培養期間中、18% のヒトglioblastoma 細胞にアポトーシスが誘導された。また、細胞増殖はほとんど観察されなかった。これに対して、グルタミン酸100 μ Mを培地中に添加すると、アポトーシスは3%まで減少し、細胞増殖能は18.5% 増加した。一方、AMPA受容体拮抗薬のNBQXはグルタミン酸誘発アポトーシス抑制作用を阻害し、アポトーシスを誘導した。また、NBQXはグルタミン酸誘発細胞増殖能を抑制した(表1 および図1)。

【0015】

【表1】

AMPA 受容体拮抗薬 NBQX の抗腫瘍作用

投与群	TUNEL-スコア	Ki-67 染色指数
グルタミン酸非含有群 (対照)	18.0 ± 2.5 %	< 0.1 %
グルタミン酸 100 μ M 添加群	3.0 ± 2.0 %	18.5 ± 3.0 %
NBQX 20 μ M + グルタミン酸 100 μ M 添加群	13.0 ± 2.0 % *	2.0 ± 1.0 % **

TUNEL-スコア：顕微鏡視野における TUNEL 陽性細胞の数を同視野における PI (propidium iodine) 陽性核の総数で除した割合

Ki-67染色指数：顕微鏡視野における Ki-67 陽性細胞の数を同視野における PI (propidium iodine) 陽性核の総数で除した割合

*P<0.03, ** P<0.001

【0016】

実験例2

in vivo 神経膠芽腫（ヒトglioblastoma）抑制作用

本実験にはヌードマウス(5-6 weeks old)を使用し、実験例1で用いたCGNH-89を皮下に 10^7 個移植した。移植翌日にマウスをランダムにゾナンパネル 100 mg/kg 投与群 (n=4) および PBS (phosphate buffered saline) 投与群 (n=4) の2グループに群分けした。薬物は移植翌日より14日間反復腹腔内投与し、投与終了後8日間まで経過観察した。腫瘍サイズはノギスにより隔日に測定し、 $(length \times width^2) \times 1/2$ という計算式により体積を算出した。

結果は平均値±標準誤差で示し、Student's t-test法を用いて統計解析を行った。 $p < 0.05$ を有意水準とした。

試験結果

AMPA受容体拮抗薬のゾナンパネルは投与開始後11および13日、投与終了後2, 4, 6 および8日で有意な増殖抑制作用を示した（図2）。

実施例（凍結乾燥製剤の製造）

メグルミン33.3gを注射用水400mlに溶解させ、これにゾナンパネル10gを加えて攪拌溶解させた。この液に、注射用水1400mlを加え、更にマンニトール40gを溶解させた後、注射用水を加えて2000mlとした。この液を常法により除菌ろ過した後、30ml容量のバイアルに15ml充填し、常法により凍結乾燥して本発明に用いられる化合物の凍結乾燥製剤を得た。

【0017】

【発明の効果】

本発明によれば、AMPA受容体拮抗作用を有する化合物、好ましくはゾナンパネルは、神経膠芽腫、特に悪性度の高い原発性神経膠芽腫に対する治療薬として有用である。

【0018】

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1はヒト glioblastoma 細胞を48時間培養した時のグルタミン酸非

含有対照群、グルタミン酸非含有培地にグルタミン酸 $100\mu\text{M}$ を添加した群およびグルタミン酸非含有培地にグルタミン酸 $100\mu\text{M}$ + NBQX $20\mu\text{M}$ を添加した群のTUNEL染色およびKi-67抗体染色を比較するグラフである。

【図2】図2はコントロール（PBS）及びゾナンパネル 100 mg/kg を腫瘍移植翌日より14日間反復腹腔内投与した際の、腫瘍体積を比較するグラフである。

【書類名】 図面

【図1】

Phase-
contrast

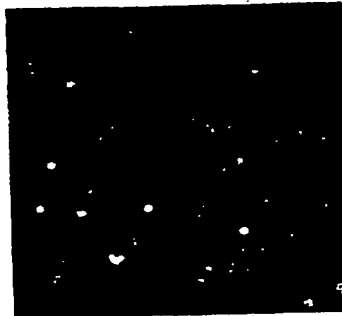
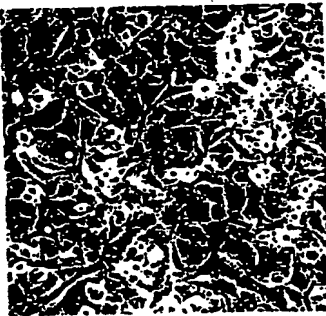
TUNEL

Ki67

グルタミン酸非含有群



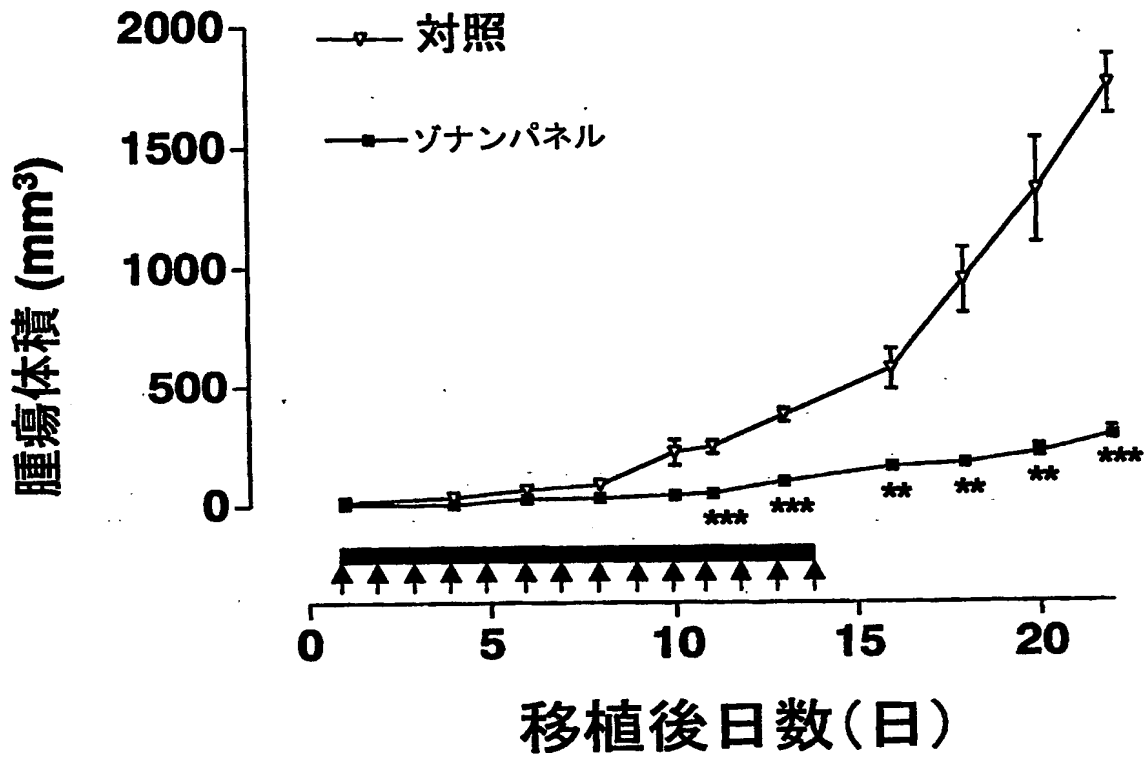
グルタミン酸100 μ M 添加群



NBQX 20 μ M +
グルタミン酸100 μ M 添加群



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の目的は新規な神経膠芽腫治療剤の提供に関する。

【解決手段】 本発明により、AMPA受容体拮抗作用を有する化合物は、神経膠芽腫、特に悪性度の高い原発性神経膠芽腫に対する治療薬として有用であることを見出し、上記課題を達成した。

【選択図】 なし

特2002-094313

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

氏 名

山之内製薬株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.